

氏名	中 原 裕 二
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2164号
学位授与の日付	平 成 13年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	口腔扁平上皮癌におけるp16 ^{INK4A} の不活化
論文審査委員	教授 永井 教之 教授 松村 智弘 教授 菅原 利夫

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

癌細胞は細胞周期制御の破綻により、自律的な増殖能を獲得する。細胞周期の制御は癌抑制遺伝子p53による経路とp16^{INK4A}- Cyclin D1 / cdk4, 6 - Rb経路などにより制御されており、その異常が多く、癌で報告されている。これらの遺伝子のうちp16^{INK4A}は種々の癌でその欠失が高頻度に検出される第9染色体短腕(9p21)に配座するcdk4,6とCyclinD1の阻害因子をコードする癌抑制遺伝子である。p16^{INK4A}遺伝子の不活化はホモ接合性欠失、点突然変異あるいはプロモーター領域のメチル化により生じ、この不活性化により細胞は増殖抑制能を失う。

本研究では、p16^{INK4A}の口腔扁平上皮癌における遺伝子変異と、p16^{INK4A}蛋白の欠失との関係について口腔扁平上皮癌細胞株、臨床材料を用いて解析し、更にp16^{INK4A}の遺伝子異常ならびに本蛋白の欠失の口腔癌の発生への関与について、臨床材料およびラットを用いた実験的発癌系にて検討した。

【材料及び方法】

1. ヒト口腔扁平上皮癌におけるp16^{INK4A}遺伝子の解析および蛋白発現

口腔扁平上皮癌細胞株10株及び臨床材料32例におけるp16^{INK4A}の遺伝子異常をPCR法、PCR-SSCP法、Methylation-specific-PCR (MSP)法を用いて解析した。また、p16^{INK4A}ポリクロナル抗体(Santa Cruz Biotechnology CA,USA)を用いて、Western blotting法ならびに免疫組織化学的にp16^{INK4A}蛋白の発現を検索した。

2. ヒト口腔扁平上皮癌における免疫組織化学染色法を用いたp16^{INK4A}蛋白の発現

正常口腔粘膜22例、口腔白板症46例を検索するとともに口腔扁平上皮癌78例の臨床材料についてp16^{INK4A}ポリクロナル抗体(Santa Cruz Biotechnology CA,USA)を用いて、免疫組織化学的にp16^{INK4A}蛋白の発現を検索するとともに臨床病理組織学的因子について検討した。

3. 実験的化学発癌

25ppmの発癌物質4-Nitroquinoline 1-Oxide(4NQO)を4週齢のDark-Agoutiラットに半年間飲水させる舌の実験的発癌系を用い、その遺伝子異常ならびに蛋白の発現について検索した。

【結果と考察】

1. ヒト口腔扁平上皮癌におけるp16^{INK4A}遺伝子の解析および蛋白発現に関する検討

口腔扁平上皮癌細胞株10株において3株にホモ接合性欠失、2株に点突然変異、2株にプロモーター領域のメチル化を認めた。p16^{INK4A}蛋白は5株に欠失を認めた。

臨床材料における口腔扁平上皮癌32例の検討では、ホモ接合性欠失は53.2%に、点突然変異は9.4%に認められ、プロモーター領域のメチル化は50%に認めた。p16^{INK4A}蛋白の欠失は71.9%に認めた。

以上の結果より、口腔扁平上皮癌においてp16^{INK4A}の不活化はホモ接合性欠失またはプロモーター領域のメチル化といった遺伝子異常をきたし、同蛋白の欠失が高頻度に生じていることが示唆された。

また、これらの臨床材料においてp16^{INK4A}遺伝子の異常が免疫組織化学的な検索の結果と一致した。

2. ヒト口腔扁平上皮癌における免疫組織化学染色法を用いたp16^{INK4A}蛋白の発現

正常口腔粘膜、軽度上皮異形成においてp16^{INK4A}蛋白の欠失は認められなかったが、中等度上皮異形成では6.3%、高度上皮異形成では42.9%、口腔扁平上皮癌においては67.9%と、高度上皮異形成から扁平上皮癌において高頻度で生じていた。また、臨床病理組織学的因子ならびに予後との間に相関は認められなかった。これらのことから、p16^{INK4A}の不活化は癌の進展ではなく、癌の発生に関与することが示唆された。

3. 実験的化学発癌

p16^{INK4A}蛋白の欠失は対象群では認められず、軽度上皮異形成でも認められなかった。しかし、発癌過程に伴い、中等度上皮異形成で12.5%、高度上皮異形成で70%、口腔扁平上皮癌では83.3%と増加した。p16^{INK4A}の欠失はすべてプロモーター領域のメチル化によるものであった。以上の結果から、p16^{INK4A}の不活化が主に口腔癌の発生に関与していることが示唆された。

【総括】

本研究では口腔扁平上皮癌におけるp16^{INK4A}の不活化の頻度およびその意味を明らかにすることを目的に検討した。その結果、p16^{INK4A}の不活化は発癌過程の高度上皮異形成ならびに口腔扁平上皮癌において高頻度に認められ、本遺伝子産物の不活化が口腔癌の発生に関与している可能性があると考えられた。

論文審査結果の要旨

癌細胞は細胞周期制御の破綻により、自律的な増殖能を獲得する。細胞周期を制御する癌抑制遺伝子のうちp16^{INK4A}は種々の癌でその欠失が高頻度に検出されている。このp16^{INK4A}遺伝子の不活化はホモ接合性欠失、点突然変異あるいはプロモーター領域のメチル化により生じ、この不活化により細胞は増殖抑制能を失う。

本研究では、口腔扁平上皮癌におけるp16^{INK4A}の不活化とその機構について、口腔扁平上皮癌細胞株、ヒト臨床材料ならびに4NQOを用いたラット発癌実験にて検討を行った。

その結果、ヒト口腔扁平上皮癌においてp16^{INK4A}の不活化が高頻度に生じており、その不活化は主にホモ接合性欠失とプロモーター領域のメチル化によるものであった。さらに、免疫組織化学的検討において正常口腔粘膜、軽度上皮異形成ではp16^{INK4A}の不活化は認められなかったが、高度上皮異形成から口腔扁平上皮癌においてp16^{INK4A}の不活化が高頻度で認められた。しかし、組織型、病期ならびに予後との間に相関は認められなかった。また、実験的化学発癌における検討では、p16^{INK4A}の不活化はすべてプロモーター領域のメチル化によるものであり、発癌に伴い高頻度にその不活化が認められた。

以上のことより、p16^{INK4A}の不活化の機構がヒト口腔扁平上皮癌とラットを用いた発癌実験において相違していることから、ヒト口腔扁平上皮癌の発生はホモ接合性欠失とプロモーター領域のメチル化により生じていると考えられた。また、p16^{INK4A}の不活化は発癌過程の高度上皮異形成ならびに口腔扁平上皮癌において高頻度に認められ、本遺伝子の不活化が口腔癌の初期発生に関与している可能性があると考えられた。

このことから、本研究の内容は今後口腔癌の発生の研究を行うにあたって価値のあるものである。したがって、本申請論文は博士（歯学）の学位授与に値するものであると判定した。